Erster Ringversuch zur Diagnostik der Enteroviren (Anzucht und Typisierung)

First Proficiency Test for Diagnosis of Enteroviruses (Cultivation and Typing)

Sabine Diedrich und E. Schreier

Zusammenfassung: Die Diagnostik der Polio- und Enteroviren hat in der Endphase der Eradikation der Poliomyelitis einen besonderen Stellenwert erlangt. Laboratorien, die Enterovirusdiagnostik durchführen, hatten bis jetzt nicht die Möglichkeit, ihre Arbeit durch Teilnahme an Ringversuchen zu kontrollieren. Um einen Überblick zur Enterovirusdiagnostik in Deutschland zu erhalten, hat das Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren am Robert Koch Institut einen Ringversuch zur Anzucht und Typisierung der Enteroviren organisiert und durchgeführt (22 Teilnehmer). Aus fünf Stuhlproben sollten Enteroviren auf Zellkultur angezüchtet und der Serotyp bestimmt werden. Der Ringversuch hat Defizite in der Diagnostik, insbesondere der Serotypbestimmung gezeigt. Nur vier Teilnehmer haben die geforderte WHO-Norm von 80% richtiger Ergebnisse erzielt. Als Standardmethode zur Enterovirustypisierung gilt nach wie vor der Neutralisationstest mit standardisierten Antisera. Andere Methoden, wie Immunfluoreszenz und PCR erwiesen sich als weitaus weniger geeignet zur Serotypisierung der Enteroviren.

Schlüsselwörter: Poliomyelitis; Enteroviren; Ringversuch; Neutralisationstest.

Summary: The diagnosis of polio- and enteroviruses has a great importance in the final stage of eradication of poliomyelitis. Laboratories carrying out diagnosis of enteroviruses had no opportunity to check the quality through participation in proficiency tests. In order to get an overview about the level of diagnosis of enteroviruses in Germany, the National Reference Laboratory for Poliomyelitis and Enteroviruses at the Robert Koch Institute has carried out a proficiency test for cultivation and typing of enteroviruses (22 participants). Five faecal samples had to be cultivated in cell cultures and serotyped. The proficiency test has revealed difficulties in the detection of enteroviruses, especially serotyping. Only four participants have passed the test (80% correct results). The method of choice for the detection of enterovirus serotype is the neutral-

isation test with standard antisera. Other methods like immunofluorescence and PCR are less suitable for serotyping of enteroviruses.

Keywords: poliomyelitis; enteroviruses; proficiency test; neutralisation test.

Die WHO definierte im Rahmen der Strategie „Gesundheit für alle bis zum Jahr 2000“ unter anderem das Ziel, in den nächsten Jahren eine weltweite Eradikation der Poliomyelitis zu erreichen, um letztlich die Immunisierung gegen diese Erkrankung einstellen zu können. Die Zertifizierung der Poliofreiheit wird zunächst auf regionaler Ebene durchgeführt. Nachdem der amerikanische Kontinent bereits 1994 als poliofrei zertifiziert wurde, strebt nun das europäische Regionalbüro der WHO an, die Zertifizierung zu erreichen. Jedes der 51 Mitgliedsstaaten muß durch ein geeignetes Surveillance-System zeigen, daß die Zirkulation der Poliovildviren unterbrochen ist. Dabei gilt die Überwachung aller akut auftretenden schlaffen Lähmungen bei Kindern unter 15 Jahren (AFP-Surveillance = acute flaccid paralysis) als Goldstandard. Als Indikator für ein funktionierendes AFP-Meldesystem gilt, daß mindestens 1 Fall auf 100.000 Kinder gemeldet und in einem von der WHO akkreditierten Labor auf Polioviren untersucht wird.

Die Bundesrepublik Deutschland beteiligt sich am WHO-Projekt zur Polioeradikation [1, 2]. Das Bundesministerium für Gesundheit hatte 1997 die Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) gebeten, eine Nationale Kommission zur Polioeradikation zu bilden. Im Ergebnis dieser Gründung wurden das Niedersächsische Landesgesundheitsamt (Hannover) und das Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren (NRZ PE) am Robert Koch Institut (RKI) für die Überwachung und virologische Abklärung aller akuten schlaffen Lähmungen verantwortlich gemacht. Seit zwei Jahren wird dieses Projekt durchgeführt. Die Ergebnisse sind nur befriedigend (erreichte AFP-Rate um 0,4 Fälle auf 100.000 Kinder).

Des weiteren wird im Zusammenhang mit der Eradikation der Poliomyelitis der Aufrechterhaltung und Kontrolle der Populationsimmunität, die einen sicheren Schutz gegen importierte Wildviren bildet, eine besondere Bedeutung beigemessen. Studien zur Immu-

Korrespondenzadresse: Dr. med. Sabine Diedrich, Nationales Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren, Robert Koch Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin. Fax: 030 4547 2617. E-mail: DiedrichS@rki.de
Eingegangen: 21. Februar 2000 / Angenommen: 15. Mai 2000

nitätslage gegen Poliomyelitis werden in Deutschland in regelmäßigen Abständen durchgeführt [3, 4].

Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, ergänzend zum AFP-Surveillance oder ausschließlich durch alternative Methoden den Nachweis der Poliofreiheit zu erbringen (Enterovirus-Surveillance, Surveillance aseptischer Meningitiden, Umweltmonitoring). Um die Ergebnisse dieser Untersuchungen bei der WHO einzureichen, müssen sie in Laboratorien durchgeführt werden, deren Arbeit z.B. durch Teilnahme an Ringversuchen qualitätsgeprüft ist. Derartige Ringversuche zum Nachweis von Enteroviren durch Virusanzucht und Typisierung wurden bis jetzt in Deutschland nicht durchgeführt.

Material und Methoden

Um einen Überblick über den derzeitigen Stand der Enterovirus-Diagnostik zu erhalten, wurde 1999 vom NRZ PE ein bundesweiter Ringversuch organisiert und durchgeführt. Das NRZ PE ist seit 1997 als Nationales Poliolabor durch die WHO akkreditiert und seit 1999 als Regionales Referenzlabor für Europa benannt. Es nimmt seit 1995 jährlich an Ringversuchen der WHO zur Anzucht/Typisierung teil. Des weiteren absolvierte das Labor im letzten Jahr den WHO-Ringversuch zur intratypischen Differenzierung der Polioviren (Unterscheidung zwischen Impf- und Wildviren). Hinzu kam ein europäischer Ringversuch zum Enterovirusnachweis mittels PCR. Alle Ringversuche wurden erfolgreich (100%) bestanden.

Hintergrund dieses Ringversuches war u.a. die Tatsache, daß in Deutschland mit dem existierenden Meldesystem positiver Virusbefunde (initiiert durch DVV

und RKI) zwar formal ein Netzwerk von Laboratorien besteht, deren Ergebnisse zur Enterovirus-Diagnostik jedoch nicht qualitätsgeprüft sind.

In diesem ersten Ringversuch sollten fünf Stuhlproben, die Enteroviren enthalten können, auf Zellkultur angezüchtet und typisiert werden. Die Teilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis. Es wurden 28 Einrichtungen (27 in Deutschland, eine in der Schweiz) angeschrieben, von denen sich 23 zur Teilnahme bereit erklärten. Der Probenversand erfolgte gekühlt (kein Trockeneis) und entsprach daher sowohl praxisnahen Bedingungen als auch den WHO-Normen.

Die Teilnehmer hatten nach Erhalt der Proben sechs Wochen Zeit, Ihre Ergebnisse mitzuteilen. Insgesamt wurden die Resultate von 22 Teilnehmern ausgewertet (ein Teilnehmer teilte die Ergebnisse verspätet mit). Die Zusammensetzung der Teilnehmer nach der Art der Einrichtung war wie folgt:

- 11 Universitäten,
- 1 Forschungsinstitut,
- 6 Landesuntersuchungsämter,
- 4 Privatlabore.

In Anlehnung an die Kriterien der WHO, wurde der Ringversuch bei Erreichen von mindestens 80% der maximalen Punktzahl als „bestanden“ gewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Offenlegung und Wertung pro Probe sowie die erzielten Ergebnisse pro Labor sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1 Wertung der Proben und Ergebnisse der Labore im Enterovirus-Ringversuch

Labor	Total	BD1	Punkte	BD2	Punkte	BD3	Punkte	BD4	Punkte	BD5	Punkte
	100	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Polio 3, Echo 30	30
1	100	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Polio 3, Echo 30	30
2	85	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Echo 30	15
3	85	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Polio 3	15
4	85	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Echo 30	15
5	75	Polio 1	0	Cox B5	20	Echo 7	20	Polio 1	20	Polio 3	15
6	70	Entero	0	Cox B5	20	Echo 7	20	-andere-	0	Polio 3, Echo 30	30
7	70	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	Entero	5	Echo 30	15
8	65	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	negativ	0	Polio 3	15
9	65	negativ	10	Cox B	20	positiv	5	Polio 1	20	positiv Polio	10
10	65	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	negativ	0	Echo 30	15
11	65	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	negativ	0	Echo 30	15
12	65	negativ	10	Cox B5	20	Echo 4	0	Polio 1	20	Echo 30	15
13	65	negativ	10	Cox B5	20	Echo 7	20	negativ	0	Polio 3	15
14	60	negativ	10	Cox B	20	Echo 7	20	Cox B	0	Polio	10
15	50	negativ	10	Cox B5	20	positiv	5	negativ	0	Echo 30	15
16	45	negativ	10	Cox B5	20	Echo 9	0	negativ	0	Echo 30	15
17	45	negativ	10	Entero 71	0	Echo 7	20	negativ	0	Echo 30	15
18	25	negativ	10	positiv	5	Cox B2	0	negativ	0	Polio 1, Polio 2, Polio 3	10
19	25	negativ	10	Entero	5	Entero	5	negativ	0	Entero	5
20	20	negativ	10	positiv	5	negativ	0	negativ	0	positiv	5
21	10	Echo 4, Echo 30	0	Echo 4, Echo 30	0	Echo 4	0	Echo 4	0	Echo 4, Echo 30	10
22	10	Entero	0	negativ	0	Entero	5	negativ	0	Entero	5

Abbildung 1 Ergebnisse im Enterovirus-Ringversuch

Abbildung 2 Anteil richtiger Ergebnisse pro Probe

Nur ein Teilnehmer erreichte die maximale Punktzahl (Abbildung 1). Insgesamt vier Teilnehmer haben mit >80% abgeschnitten. 18 Einrichtungen erfüllten die geforderte Norm nicht. Der erzielte Mittelwert lag bei 57%.

Als besonders schwierig erwiesen sich die Proben BD4 (Poliovirus Typ 1 in niedriger Konzentration) und BD5 (Virusgemisch aus Echovirus Typ 30 und Poliovirus Typ 3 [in niedrigerer Konzentration]) (Abb. 2). Vier Teilnehmer (18%) hatten bei der Negativprobe BD1 ein falsch positives Ergebnis erzielt.

Die Resultate wurden auch in Abhängigkeit von den zur Virusanzucht verwendeten Zellen und Methoden zur Typisierung ausgewertet. Im Ringversuch wurde eine breite Auswahl an Zelllinien (die in den jeweiligen Einrichtungen routinemäßig geführt werden) eingesetzt (RD, Fl. CaCo, Vero, BGM, GMK, HeLa u.a.). Es konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen verwendeten Zelllinien und erreichter Punktzahl ermittelt werden. Bei guter Sensitivität der Zelllinien, die durch regelmäßige interne Qualitätskontrollen geprüft werden sollte, sind die verwendeten Zellen für die Diagnostik der Enteroviren gut geeignet. Speziell für den Nachweis der Polioviren empfiehlt die WHO den Einsatz von RD- (Rhabdomyosarkom) und L20B-Zellen (transgene Mauslinie, die den humanen Poliovirusrezeptor enthält und somit poliospezifisch ist). Für den Einsatz in der Routinediagnostik ist jedoch die L20B nicht zwingend erforderlich.

Als Methode der Wahl zur Typisierung gilt nach wie vor der Neutralisationstest mit standardisierten Antisera (LBM oder WHO/Bilthoven) [5, 6]. Der Ringversuch hat bestätigt, daß Labore, die nach WHO-Empfehlungen (Neutralisationstest) gearbeitet haben, im

Durchschnitt bessere Ergebnisse erzielt haben. Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern sowie PCR/ Sequenzierung erwiesen sich als weniger geeignet zur Typisierung von Enteroviren.

Um die Stabilität der Enteroviren im Stuhl zu beweisen, wurden im NPZ PE Aliquots sämtlicher Virus-positiver Proben aus dem Ringversuch 48 Stunden bei 8°C und zusätzlich 48 Stunden bei 37°C gelagert. Danach konnten die Viren in den Proben BD2-BD5 angezüchtet werden. Das Poliovirus Typ 1 in der Stuhlprobe BD4 und das Poliovirus Typ 3 in der Probe BD5 verursachte in der Regel erst nach der 2. Passage einen zytopathischen Effekt.

Folgende Schlußfolgerungen und Hinweise sollten beachtet werden:

- Der Ringversuch zur Anzucht und Typisierung hat Defizite bei der Serotypbestimmung der Enteroviren gezeigt.
- Als Standardmethode zur Enterovirustypisierung gilt der Neutralisationstest mit standardisierten Antisera.
- Ein Anzuchtergebnis sollte erst nach drei Passagen auf Zellkultur als negativ bewertet werden.
- Bei vermuteten Doppelinfektionen sollte das Virus auch in Gegenwart eines entsprechenden homologen Immunsersums kultiviert werden.

Die konzeptionelle Gestaltung des Ringversuches war im Hinblick auf das Polio-Eradikationsprogramm der WHO sowohl auf die Anzucht als auch die Serotypbestimmung der Enteroviren ausgerichtet. Serotypisierung und der Nachweis von Doppelinfektionen können epidemiologisch wichtige Daten liefern, sind jedoch für den Kliniker weniger relevant.

Es ist geplant, einen Ringversuch dieser Art zu wiederholen.

Danksagung

Das Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren bedankt sich bei allen Einrichtungen für die Bereitschaft, am Ringversuch teilzunehmen.

Literatur

1. Windorfer A, Feil F. Der Kampf gegen Poliomyelitis - die Ausrottung einer Zivilisationsseuche. Bundesgesundheitsbl 2000; 43: 2-6.
2. Feil F, Windorfer A, Diedrich S, Schreier E. Poliomyelitis - Von der Krankheitsvermeidung zur Krankheitsausrottung. WHO Projekt der Polioeradikation und ihre Überwachung als gesundheitspolitische Herausforderung an die Medizin in der Bundesrepublik Deutschland. Dtsch Ärztebl 2000; Ausg. A, im Druck
3. Diedrich S, Claus H, Thierfelder W, Bellach B-M, Schreier E. Bundesgesundheitsurvey 1997/98: Immunitätslage gegen Poliomyelitis. Dtsch Med Wschr 2000; 125: 584-8.
4. Franck S, Allwinn R, Rabenau HF, Doerr HW. Epidemiological analysis of immunity to poliovirus after termination of an era of vaccination with OPV in Germany. An analysis of the German Association Against Viral Diseases (DVG). Zentralbl Bakteriell 1999; 289: 475-81.
5. WHO: Poliovirus neutralizing antibody assay. Bull WHO 70 1992; 669.
6. WHO: Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97.01. 1997; 44-51.